

選択的スプライシングを受ける遺伝子の探索とシス・エレメントの体系的解析

●黒柳 秀人¹⁾ ◆荻島 創一²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所 2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所

<研究の目的と進め方>

mRNA 前駆体 (pre-mRNA) の選択的スプライシングは、ひとつの遺伝子から多様なタンパク質を造り出す機構で、多細胞生物の比較的少ない遺伝子からタンパク質発現の時間的・空間的多様性を生み出すための最も重要な機構のひとつである。生体内の各細胞における各遺伝子の選択的スプライシングは、トランスの制御因子とそれらが認識する転写産物上の配列または構造情報 (シス・エレメント) により制御されるが、その分子機構の全容解明が今後の重要な課題である。

研究代表者らは、これまでに、蛍光タンパク質遺伝子を用いて生体における選択的スプライシング・パターンを各細胞レベルで可視化できるトランスジェニック線虫作製法を開発し、各組織・細胞における選択性を生体内でプロファイリングできること、選択性の制御に必要なシス・エレメントを同定できること、選択性を制御するトランス因子の変異体を単離し原因遺伝子を同定できることを示してきた。代表者と分担者は、すでに平成 18 年度途中より、代表者のこれまでの研究で得られた選択的スプライシング制御因子変異体と線虫ゲノム・タイリング・アレイを用いて、制御因子の標的遺伝子の網羅的探索の予備的解析を進めており、分担者は、その一環として、タイリング・アレイの解析のための、計算機による解析パイプラインを構築している。

本研究課題では、スプライシング制御の規則性、特に塩基配列に刻まれた「スプライシング暗号」の解明を目指す。そのために、上述の選択的スプライシング制御因子の変異体線虫を用い、i) 野生型と変異体でそれぞれ発現している mRNA のアイソフォームを大量・高速に比較することで、変異体において選択的スプライシング異常を起こしている遺伝子、すなわち制御因子の標的となっている可能性がある遺伝子を網羅的に探索するための実験的・情報学的方法論の開発し、実験的に検証を行って標的遺伝子を同定すること、ii) 同定した標的遺伝子の塩基配列を基に、選択的スプライシングを制御するシス・エレメントの配列を生物情報学的に予測し、予測されたエレメントの必要性や制御されるエクソンとの相対的位置関係、他のシス・エレメントとの協調性について実験的に検証すること、を行い、生体における選択的スプライシングの時間的・空間的制御に必要な配列・構造情報の規則性を明らかにすることを目的とする。

<2008 年度の研究の当初計画>

申請者らのこれまでの解析により得た 3 種類の変異体および野生型線虫を同調飼育して全 RNA を調製し、下記の方法により標的遺伝子候補を探索し、実験的検証を繰り返すことで、より精度の高い標的遺伝子探索方法を確立する。

i) 野生型およびスプライシング変異体の mRNA アイソフォームの比較データの取得：①タイリング・アレイ、または、②超

大量シーケンスの各方法でデータを取得し、野生型と変異体のデータの生物情報学的比較により、発現量に差がある mRNA アイソフォームを抽出する。

ii) ゲノム塩基配列からの標的遺伝子の予測：ゲノム情報が入手可能な同属の 3 種の線虫で選択的スプライス部位周辺のゲノム配列にこの配列が保存されている遺伝子を生物情報学的に Smith-Waterman 法を用いて探索する。

iii) 標的候補遺伝子のスプライシング・パターンの実験的検証：RT-PCR 産物のクローニングや直接シーケンスにより mRNA アイソフォームの同定を行い、選択的スプライシングの有無や変異体における発現量の差異を実験的に検証する。

<2008 年度の成果>

2008 年度は、主に、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を野生型およびスプライシング変異体の線虫に対して行うことを目指して、異なる株で RNA 調製の条件を揃えるための飼育方法の検討や、抽出した全 RNA から次世代シーケンサー解析にかけるための DNA 断片ライブラリーの作製方法の検討を行った。

線虫を通常の状態では飼育するとさまざまな成長段階の虫が混在した状態になるが、成長段階に依存して発現が変化する転写産物が存在すること、成長に伴って、各組織の相対的な大きさの差が拡大すること、次世代シーケンサーでの解析に十分な試料を用意する必要があること、などから、液体培養によって大量に線虫を飼育した上で卵のみを抽出して同調し、餌のない状態で孵化させて L1 ステージで回収するのが最も飼育条件をそろえやすいとの結論に至った。

トランスクリプトーム解析によってスプライシング・パターンを解析するためには、偏りのないライブラリーの作製が不可欠である。全 RNA から短い cDNA ライブラリーを作製するには、大きく分けて、cDNA を調製してから断片化する方法と、RNA を断片化してから cDNA を調製する方法がありうる。長い RNA からの逆転写には RNA の 2 次構造や長さなどが影響を与えることから、mRNA の全長にわたって偏りなく cDNA 化するには、RNA 段階で適度な長さまで断片化した上で効率よく逆転写および第 2 鎖の合成を行うのが望ましいと考えられる。亜鉛イオン存在下で 70 度の熱処理をすることで RNA が再現性良く 100 塩基前後に断片化されることが確認できたことから、全 RNA を調製後、poly(A) 鎖を持つ RNA のみを精製した上で、この断片化処理を行い、ランダム 6 mer プライマーによる逆転写と DNA ポリメラーゼによる第 2 鎖の合成で 2 本差 cDNA の調製に至る方法を標準と定めた。

現在、上述の飼育方法および cDNA ライブラリーの作製方法により、線虫の野生型株 N2、代表者らが同定した Fox-1 ファミリー

スプライシング制御因子 ASD-1 と FOX-1 の二重変異体、および asd-2 変異体について、cDNA ライブラリーの調製を行っている。

<国内外での成果の位置づけ>

代表者らは、2種類の蛍光タンパク質を利用した生体内選択的スプライシング可視化技術を開発し、選択的スプライシング・パターンを線虫生体内で可視化することに成功したほか、蛍光タンパク質の発現を指標とした変異体のスクリーニングによってスプライシング制御因子の変異体を単離し因子を同定できること、シス・エレメントを実験的に解析できることを示してきた。蛍光タンパク質を利用した選択的スプライシングの可視化は、代表者らと前後して哺乳類の培養細胞の例が報告されたが、動物個体で可視化に成功したこと、未知の制御因子を同定できたことにおいて、代表者らの成果は特筆されるものである。線虫をモデル生物としたことで、選択的スプライシング制御因子の変異体を幾種類も効率良く単離し、その後の遺伝学的な解析を行えることは、本研究課題の立案、遂行の上でも重要なアドバンテージである。

一方、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析による選択的スプライシングの網羅的解析については、2008年末に Burge らによって最初の大きな論文発表がなされた。それによればヒトでは実に90%以上のタンパク質遺伝子が何らかの選択的スプライシングを受けており、スプライシング制御の研究はさらに対象を広げることとなった。

生物情報学的な解析によるスプライシング制御のシス・エレメントの予測はこれまでも行われていたが、次世代シーケンサーによって得られたデータを基にさらに解析を進めた例が今後も発表されると予測される。本研究課題でも、野生型とスプライシング変異体とのトランスクリプトームの比較により新たな標的遺伝子や制御エレメントの発見を目指しているが、スプライシング制御因子の変異体を用いて生体で解析している点、スプライシング・レポーター・ミニ遺伝子によって実験的にシス・エレメントの検証ができる点が、本研究の特徴である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初計画では、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析も検討していたが、マイクロアレイ解析の定量性や検出感度の限界から考えて、将来的には次世代シーケンサーにより解析を中心にするのが望ましいとの結論に至り、今年度は、時間をかけて、線虫でのトランスクリプトーム解析の条件検討を行ってきた。そのため、この原稿執筆時点ではライブラリーの作製に目途がついた段階であり、シーケンスのデータを得るには至っていない。今後、実際に一度シーケンス解析を行い、スプライシング変異体で選択的スプライシング・パターンに異常が生じる既知の標的遺伝子について、スプライシング・パターンの異常をシーケンス・タグの頻度の差で検出できるか検証を行い、必要ならばさらに解読するタグの数を増やしたうえで、網羅的な標的遺伝子候補の探索を進めていくこととなる。

<今後の課題>

来年度は、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析で予測された標的遺伝子候補について、野生型とスプライシング変異体で RT-PCR 解析を行い、実際に、スプライシング異常が起きているかを検証する。こうして得られた真の標的遺伝子について、選択的エクソンの周辺配列の生物情報学的な解析を行

い、シス・エレメントの予測を行い、スプライシング・レポーター・ミニ遺伝子を作製して、検証を行っていく。

本研究課題では、代表者らが新たに得たスプライシング変異体についてもトランスクリプトーム解析を進めて、より多くの選択的スプライシングの標的遺伝子を探索してシス・エレメントに規則性を見出し、「スプライシング暗号」の一般化、解読を目指す。次世代シーケンサーのデータ処理のノウハウやそのための人材育成などソフトの面でも時機を逃さず体制を整えて研究を進めていくことがますます重要になると思われる。

<成果公表リスト>

- 805191940 (論文)
Ohno, G., Hagiwara, M., and Kuroyanagi, H., STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo., *Genes & Development*, 22, 360-374 (2008)
- 805192021 (新聞記事)
須田桃子, たんぱく作り分け 遺伝子の暗号特定 東京医科歯科大が手法開発, 毎日新聞朝刊2面, 2008/01/30
- 901190019 (その他)
Anne Blewett, Technology: Colour-changing worms, *Nature Reviews Genetics* 9, 159, 2008, <http://www.nature.com/nrg/journal/v9/n3/full/nrg2333.html>, 2008/02/12
- 901190025 (その他)
Technology Watch: Colour-changing worms, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 188, 2008, <http://www.nature.com/nrm/journal/v9/n3/full/nrm2356.html#Colourchanging-worms>, 2008/02/13
- 901190038 (その他)
Charles J. David and James L. Manley, PERSPECTIVE The search for alternative splicing regulators: new approaches offer a path to a splicing code, *Genes & Development* (2008) 22: 279-285., <http://genesdev.cshlp.org/content/22/3/279.full>, 2008/02/01